

VI. Identificación de *Vibrio cholerae* en el laboratorio

Los miembros del género *Vibrio* son bacilos gramnegativos curvos o rectos, anaerobios facultativos, asporógenos y móviles. Los vibriones pueden requerir NaCl o que su crecimiento se estimule por la adición de este. Todos los miembros del género *Vibrio*, con excepción de *V. metschnikovii* y *V. gazogenes*, son oxidasa positivos y reducen los nitratos a nitritos. La familia *Vibrionaceae* incluye muchas especies, que en su mayor parte son habitantes normales del ambiente acuático. De más de 30 especies del complejo *Vibrio-Photobacterium*, solo 12 se han reconocido como patógenos para el ser humano (Cuadro VI-1). Aunque la mayor parte de estas 12 especies se aíslan en caso de infecciones intestinales y extraintestinales, solo *V. cholerae* se asocia con el cólera epidémico.

Los vibriones no identificados se han denominado “especies marinas” o, simplemente, “vibriones marinos”. Estas especies marinas se definen como cepas de *Vibrio* o *Photobacterium* oxidasa positivas; fermentan la *D*-glucosa, no crecen en caldo nutritivo sin NaCl, pero crecen si este se agrega. La mayor parte de los microorganismos aislados de aguas de los océanos o los estuarios pertenecen al grupo de “vibriones marinos” y son difíciles de identificar excepto en unos cuantos laboratorios especializados. Debido a que no se asocian con enfermedades humanas, los vibriones marinos de ordinario no tienen que ser identificados. Los laboratorios clínicos y de salud pública por lo general notifican los vibriones patógenos para el ser humano indicando el género y la especie, y todos los demás como “vibriones marinos”.

La identificación mínima de *V. cholerae* O1 solo requiere la confirmación serológica de la presencia de antígenos del serotipo O1 en los aislamientos sospechosos. Sin embargo, puede ser necesaria una caracterización más completa del microorganismo que incluya diversas pruebas bioquímicas así como la determinación de otras características. El laboratorio debe decidir cuándo es apropiado realizar estas pruebas adicionales en los aislamientos clínicos, ya que no deben formar parte de la identificación común de *V. cholerae* O1. En términos generales, si el aislamiento proviene de una región amenazada por el cólera epidémico o que se encuentra en las primeras fases de un brote de cólera, es apropiado confirmar la producción de toxina del cólera y la identificación bioquímica. Otras pruebas que podrían brindar importante información de salud pública son las de hemólisis, biotipificación, subtipificación molecular y sensibilidad a los antimicrobianos. Estas pruebas solo se deben realizar en un número limitado de aislamientos. (Véase el Capítulo II, “La función del laboratorio de salud pública”.)

A. Identificación serológica de *V. cholerae* O1

El uso de antisueros es uno de los métodos más rápidos y específicos para la identificación de *V. cholerae* O1. Aunque para el tratamiento del cólera no es necesario identificar el serogrupo y el serotipo de los aisla-

Cuadro VI-1. Ocho pruebas diferenciales clave para dividir en seis grupos las 12 especies del género *Vibrio* que tienen importancia clínica (1)

Reacción de la especie en:	Prueba							
	Crecimiento en caldo nutritivo*		Nitrito a nitrito	Fermentación de mio-inositol	Dihidrolasa de arginina	Descarboxilasa de lisina	Descarboxilasa de ornitina	
	0% de NaCl	1% de NaCl						
Grupo 1								
<i>V. cholerae</i>	+	+	+	-	-	+	+	+
<i>V. mimicus</i>	+	+	+	-	-	+	+	+
Grupo 2								
<i>V. metschnikovii</i>	-	+	-	V	V	V	V	-
Grupo 3								
<i>V. cincinnatiensis</i>	-	+	+	+	-	V	V	-
Grupo 4								
<i>V. hollisae</i>	-	+	+	-	-	-	-	-
Grupo 5								
<i>V. damsela</i>	-	+	+	-	+	V	-	-
<i>V. fluvialis</i>	-	+	+	-	+	-	-	-
<i>V. furnissii</i>	-	+	+	-	+	-	-	-
Grupo 6								
<i>V. alginolyticus</i>	-	+	+	-	-	+	+	V
<i>V. parahaemolyticus</i>	-	+	+	-	-	+	+	+
<i>V. vulnificus</i>	-	+	+	-	-	+	+	V
<i>V. carchariae</i>	-	+	+	-	-	+	+	-

Nota: + = ≥90% positivo; - = <10% positivo; V (variable) = 10 a 89% positivo.

*Difco Laboratories, Detroit, Michigan, Estados Unidos.

mientos de *V. cholerae*, esta información puede ser de importancia en epidemiología y en salud pública (Cuadro VI-2).

1. Serogrupos de *V. cholerae* O1

Con base en la presencia de antígenos somáticos O, se ha determinado que existen más de 130 serogrupos de *V. cholerae*. Sin embargo, solo el serogrupo O1 se relaciona con el cólera epidémico y pandémico. Otros serogrupos se pueden vincular con diarrea grave, pero no poseen el potencial epidémico de los aislamientos O1 y no aglutinan con antisueros O1. Es común el aislamiento de *V. cholerae* distinto de O1 en muestras tomadas de fuentes ambientales, a pesar de la ausencia de casos de diarrea. Debido a la posibilidad de confusión, los laboratorios pueden optar por no informar el aislamiento de *V. cholerae* distinto de O1 o informan como *V. cholerae* no O1, pero cuando se investigan las epidemias de cólera algunos prestadores de atención de salud o los funcionarios de sanidad quizá no conozcan las importantes diferencias epidemiológicas entre los aislamientos O1 y los distintos del O1. El nombre "*Vibrio cholerae*" escrito en un informe de laboratorio puede llevar a concluir, erróneamente, que un aislamiento distinto de O1 tiene importancia epidemiológica. La confusión se puede evitar con solo informar si se aisló o no *V. cholerae* serogrupo O1.

2. Serotipos de *V. cholerae* O1

Los aislamientos del serogrupo O1 de *V. cholerae* se han subdividido en tres serotipos: Inaba, Ogawa e Hikojima (muy raro). La identificación del serotipo se basa en la aglutinación con antisueros dirigidos contra antígenos tipospecíficos O (véase el Cuadro VI-3). La identificación de estos antígenos es válida solamente con aislamientos de serogrupos O1. Por esta razón, los antisueros Inaba y Ogawa nunca deben usarse con cepas

Cuadro VI-2. Características de *Vibrio cholerae*

Sistemas de tipificación	Relacionados con epidemias	No relacionados con epidemias
Serogrupos	O1	Distintos del O1 (existen > 130)
Biotipos	Clásico y El Tor	Los biotipos no se aplican a las cepas que no son O1
Serotipos	Inaba, Ogawa e Hikojima	Estos 3 serotipos no se aplican a las cepas que no son O1
Producción de toxina	Produce toxina del cólera ^a	Generalmente no producen toxina del cólera, a veces producen otras toxinas

^aExisten cepas O1 que no son toxigénicas, pero no están relacionadas con epidemias.

Cuadro VI-3. Serotipos de *V. cholerae* serogrupo O1

Serotipo	Principales factores O presentes	Aglutinación en suero absorbido	
		Ogawa	Inaba
Ogawa	A, B	+	-
Inaba	A, C	-	+
Hikojima	A, B, C	+	+

que son negativas frente a los antisueros polivalentes O1. Los aislamientos que aglutinan débil o lentamente con los antisueros del serogrupo O1 pero no aglutinan con los antisueros Inaba ni Ogawa no se consideran del serogrupo O1.

Las cepas de un serotipo frecuentemente reaccionan en forma cruzada, lenta y débilmente con el antisuero de otro serotipo, lo cual depende de cuán bien sean absorbidos los antisueros específicos para el serotipo. Las reacciones de aglutinación con antisueros Inaba y Ogawa se examinarán de manera simultánea, y la reacción más intensa y más rápida dará la pauta para identificar el serotipo. Si los antisueros están absorbidos adecuadamente, son raras las cepas que aglutinan con una reacción vigorosa e igual con los antisueros Ogawa e Inaba. Si se sospecha de tales reacciones, las cepas se enviarán a un laboratorio de referencia para examen más a fondo, designándolas como "posible serotipo Hikojima".

3. Aglutinación en lámina

Las pruebas de aglutinación para los antígenos somáticos O de *V. cholerae* se pueden llevar a cabo en una caja de Petri o en una lámina de vidrio limpia. Para retirar una porción del cultivo de la superficie del agar de infusión de corazón (HIA), agar hierro de Kligler (KIA), agar de tres azúcares (TSI) u otro medio de agar no selectivo, se puede utilizar un asa de inoculación, una aguja, un aplicador estéril o un palillo de dientes. Dicha porción se emulsifica en una gota pequeña de suero fisiológico y se mezcla muy bien mediante movimientos de balance de la lámina hacia atrás y adelante durante cerca de 30 segundos. Se examina la suspensión cuidadosamente para comprobar que sea uniforme y no tenga grumos producidos por la autoaglutinación. Si se observa aglutinación, el cultivo se considerará "rugoso" y por lo tanto no se puede serotipificar. Si la suspensión es lisa (turbia y fluida), se le agrega una pequeña gota de antisuero. Por lo general, se mezclan volúmenes casi iguales del antisuero y la suspensión de colonias, pero el volumen de suspensión puede ser hasta el doble del volumen de antisuero. Para ahorrar antisuero se pueden utilizar volúmenes muy pequeños, incluso de 10 μ l. Se mezclan bien la suspensión y el antisuero, y se

balancea la lámina hacia atrás y adelante para observar la aglutinación. Si la reacción es positiva, en un lapso de 30 segundos a 1 minuto aparece una aglutinación muy intensa (Figura VI-1).

B. Identificación bioquímica de *V. cholerae*

Debido a que la confirmación de *V. cholerae* O1 requiere tan solo la identificación de los antígenos del serotipo O1 por aglutinación en lámina, la confirmación bioquímica rara vez es necesaria (véase el Capítulo II, "La función del laboratorio de salud pública"). En el Cuadro VI-4 se presenta una breve lista de pruebas bioquímicas que se pueden utilizar para confirmar aislamientos de *V. cholerae*. Si los resultados de las pruebas con un aislamiento son los mismos que se muestran en el Cuadro VI-4, la identificación del aislamiento se confirma como *V. cholerae*. Sin embargo, si el aislamiento no da los resultados que se muestran en el cuadro, será necesario aplicar pruebas adicionales para la identificación. Véanse en el Capítulo XI, "Preparación de medios de cultivo y reactivos", las instrucciones para preparar los medios de cultivo y los reactivos para las pruebas bioquímicas que se muestran en el Cuadro VI-4. El uso de los medios de cultivo KIA o TSI, las pruebas de la oxidasa y del "hilo mucoide", y las reacciones de arginina y lisina pueden ser útiles para seleccionar aislamientos que parezcan

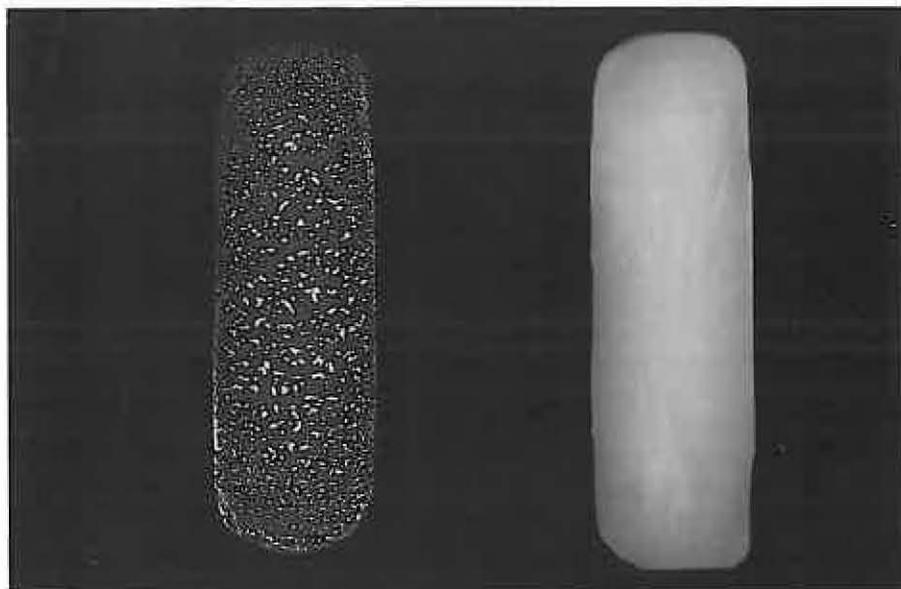


Figura VI-1. Los antisueros contra el serogrupo O1 de *V. cholerae* aglutinan los microorganismos homólogos (izquierda). Un testigo de suero normal o de solución salina (derecha) no presenta aglutinación.

Cuadro VI-4. Características bioquímicas de aislamientos típicos de *V. cholerae* O1

Prueba	% Positivo
Oxidasa	100
Hilo mucoide	100
Agar hierro de Kligler	K/A, sin gas, sin H ₂ S
Agar hierro de tres azúcares	A/A, sin gas, sin H ₂ S
Glucosa ^a (producción de ácido)	100
Glucosa (producción de gas)	0
Sacarosa (producción de ácido)	100
Lisina ^a	99
Arginina ^a	0
Ornitina ^a	99
Crecimiento en 0% de NaCl ^b	100
Crecimiento en 1% de NaCl ^b	100
Voges-Proskauer ^a	75 ^c

Nota: K/A = alcalinidad/acidez; A/A = acidez/acidez.

^aModificada mediante la adición de 1% de NaCl.

^bBase de caldo nutritivo (Difco Laboratories).

^cLa mayor parte de los aislamientos de *V. cholerae* serotipo O1, biotipo El Tor, dan positiva la prueba de Voges-Proskauer, mientras que las cepas del biotipo clásico la dan negativa.

V. cholerae. Los procedimientos de selección para muestras fecales y ambientales se exponen en los Capítulos IV y V.

1. Prueba de la oxidasa

La prueba de la oxidasa se lleva a cabo con colonias aisladas recientemente en agar de infusión de corazón (HIA) con plano inclinado o en cualquier otro medio que no contenga carbohidratos. No se utilizarán colonias aisladas en agar TCBS. Se colocan dos o tres gotas del reactivo de oxidasa (tetrametil-*p*-fenilendiamina al 1%) sobre un pedazo de papel filtro en una caja de Petri. Se extiende el cultivo sobre el papel húmedo con un asa de platino (no de micromio), un aplicador de madera o un palillo de dientes estéril. En una reacción positiva, el cultivo bacteriano se torna morado oscuro en 10 segundos (Figura VI-2). No se toma en cuenta el color que aparezca después de 10 segundos. Deben probarse al mismo tiempo testigos positivo y negativo. Los microorganismos de los géneros *Vibrio*, *Neisseria*, *Campylobacter*, *Aeromonas*, *Plesiomonas*, *Pseudomonas* y *Alcaligenes* son oxidasa positivos; los de la familia *Enterobacteriaceae* son oxidasa negativos.

2. Prueba del hilo mucolde

La prueba de la hebra o hilo mucoide se puede realizar en un portaobjetos o en una caja de Petri de plástico, donde se suspenden colonias (ob-



Figura VI-2. Una prueba positiva de la oxidasa (como se muestra aquí) da por resultado la aparición de un color morado oscuro en 10 segundos. *V. cholerae* es oxidasa positivo, lo cual lo diferencia de los microorganismos oxidasa negativos tales como los miembros de la familia *Enterobacteriaceae*.

tenidas por cultivo durante 18 a 24 horas en agar de infusión de corazón u otro medio no inhibitorio) en una gota de solución acuosa de desoxicolato de sodio al 0,5%. Si el resultado es positivo, las células bacterianas se lisan por efecto del desoxicolato, con lo cual la suspensión perderá turbidez y el DNA liberado de las células lisadas ocasionará que la mezcla se haga viscosa. Al retirar lentamente de la suspensión el asa, se forma un "hilo" mucoso (Figura VI-3). La mayor parte de los vibriones son positivos, en tanto que las cepas de *Aeromonas* suelen ser negativas.

3. Agar hierro de Kligler o agar hierro de tres azúcares

El agar hierro de Kligler (KIA) y el agar hierro de tres azúcares (TSI) son medios selectivos que contienen carbohidratos y son de uso general en la microbiología de diagnóstico. Aunque se usan de modo parecido, contienen distintos carbohidratos. Las reacciones de *V. cholerae* en KIA, que contiene glucosa y lactosa, son similares a las de los miembros de la familia *Enterobacteriaceae* que no fermentan la lactosa (K/A, y no producen gas ni H_2S) (Figura VI-4). El medio TSI, que contiene sacarosa además de glucosa y lactosa, presenta reacciones de A/A y no produce gas ni H_2S . Los tubos de KIA o TSI con plano inclinado se inoculan mediante picadura y estriación. Los tubos se incuban a una temperatura de 35° a 37 °C y se



Figura VI-3. Se muestra aquí una prueba del hilo mucoide positiva con *V. cholerae*; es un método rápido y sencillo para distinguir entre el género *Vibrio* (fundamentalmente positivo) y *Aeromonas* (casi siempre negativo).

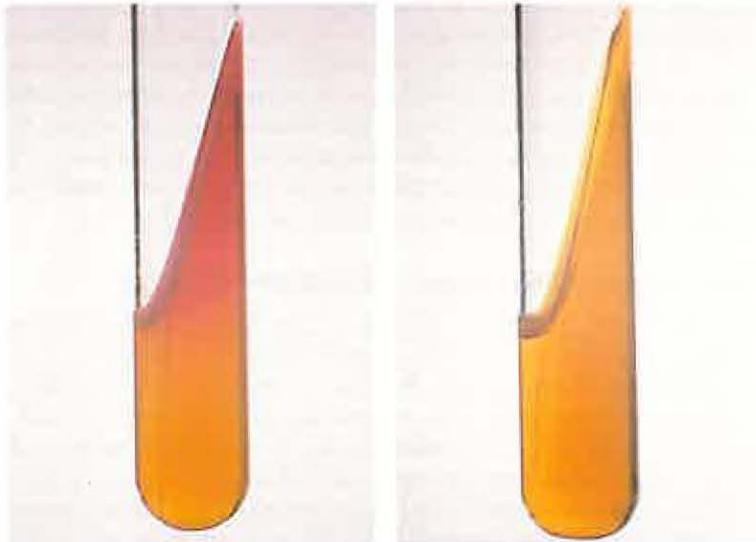


Figura VI-4. Reacciones de *V. cholerae* en agar hierro de Kligler (izquierda) y agar hierro de tres azúcares (derecha).

examinan después de 18 a 24 horas. Las tapas de todos los tubos de las reacciones bioquímicas deben mantenerse poco apretadas antes de la incubación, pero esta condición es particularmente importante para los tubos de KIA y agar TSI. Si las tapas están demasiado apretadas y existen condiciones anaerobias en dichos tubos, las reacciones características de *V. cholerae* quizá no se presenten y puede ocurrir una reacción inapropiada.

4. Carbohidratos

Los caldos de glucosa y sacarosa deben inocularse ligeramente con cultivos recién obtenidos. Los caldos se incuban a una temperatura de 35° a 37 °C y se observan a las 24 horas. Si las pruebas de fermentación son negativas a las 24 horas, hay que incubarlos hasta 7 días. Cuando se utiliza indicador de Andrade en el medio de cultivo, la producción de ácido se pone de manifiesto por la aparición de color rosado (Figura VI-5). *V. cholerae* fermenta la glucosa y la sacarosa, pero no produce gas a partir de ellas.

5. Reacciones de descarboxilasa y dihidrolasa

Los caldos para las pruebas de arginina, lisina, ornitina y testigo (sin aminoácidos), modificados por la adición de 1% de NaCl, se inoculan ligera-

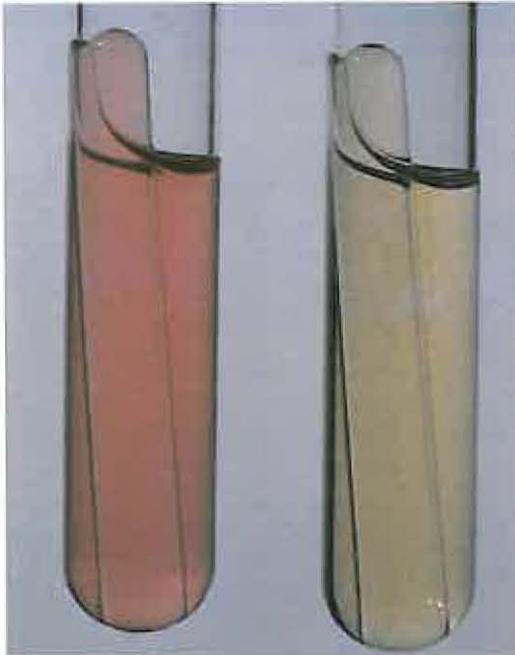


Figura VI-5. Con el indicador de Andrade en el medio de carbohidratos, si hay fermentación aparece un color rosado; en las reacciones negativas el color es amarillo.

Identificación de *Vibrio cholerae* en el laboratorio

mente a partir de un cultivo recién obtenido. Al caldo en cada tubo se agrega una capa superficial de aceite mineral estéril de 4 a 5 mm de espesor. Se incuba a una temperatura de 35° a 37 °C y se lee a las 24 y 48 horas, pero si la prueba es negativa se incuba hasta 7 días. Cuando se utilizan como indicadores el púrpura de bromocresol y el rojo de cresol, una reacción alcalina (positiva) da color morado, en tanto que una reacción negativa o ácida se indica por un color amarillo (Figura VI-6). La prueba es válida solamente si el tubo testigo permanece negativo (amarillo). *V. cholerae* es típicamente positivo para la descarboxilasa de lisina, en tanto que otras especies de *Vibrio* son negativas y las de *Aeromonas* dan reacciones variables. *V. cholerae* es típicamente negativo para la dihidrolasa de arginina, en tanto que *Aeromonas*, *Plesiomonas* y ciertas especies de *Vibrio* son positivos. *V. cholerae* es positivo para la descarboxilasa de ornitina.

Tubos de agar con hierro y lisina y de glucosa con arginina de plano inclinado

En lugar del caldo de lisina (véase el párrafo precedente), para investigar la producción de descarboxilasa de lisina se puede usar un tubo de agar con hierro y lisina (LIA) de plano inclinado. De modo análogo, en lugar del caldo de arginina, para investigar la producción de dihidrolasa de arginina se puede utilizar un tubo semejante de glucosa con arginina (AGS; Administración de Alimentos y Medicamentos de los Estados Unidos. *Bacteriological Analytical Manual*, 6ª edición. Arlington, Virginia:

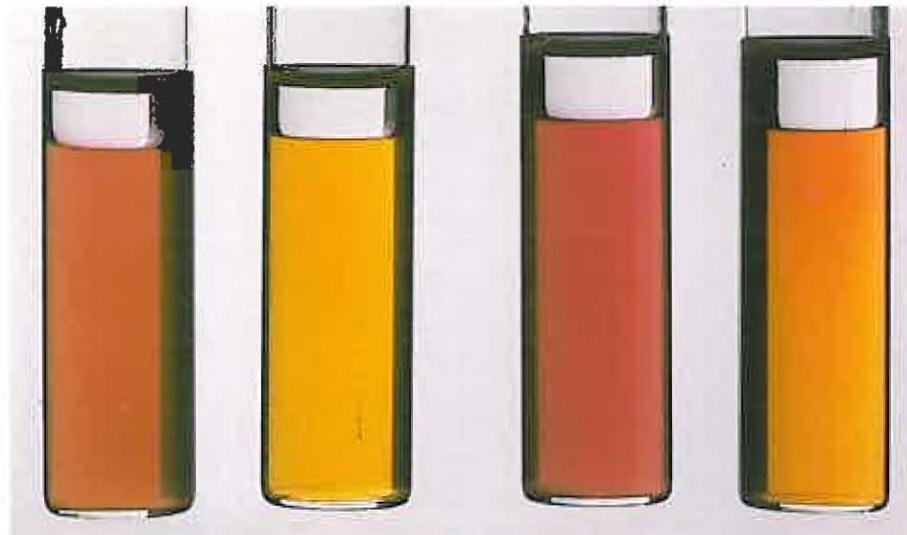


Figura VI-6. Reacciones de descarboxilasa y dihidrolasa para *V. cholerae*; de izquierda a derecha: lisina (+), arginina (-), ornitina (+) y testigo (-).

Association of Official Analytical Chemists, 1992). Estos tubos de plano inclinado se utilizan con mayor frecuencia como parte del proceso de selección (véanse los Capítulos IV y V). Los tubos de LIA y AGS se inoculan mediante picadura y estriación. Los microorganismos que producen descarboxilasa de lisina en LIA (o dihidrolasa de arginina en AGS) causan una reacción alcalina (color morado) en todo el medio. Los microorganismos que no poseen estas enzimas producen típicamente una superficie alcalina (morado) y un fondo ácido (amarillo). *V. cholerae* da una reacción K/K en LIA (lisina positiva), pero produce una reacción K/A (arginina negativa) en AGS.

6. Caldos con sal

Los caldos con sal al 0% y al 1% (base de caldo nutritivo [Difco Laboratories, Detroit, Michigan]; véanse en el Capítulo XI, "Preparación de medios de cultivo y reactivos", las instrucciones especiales para la preparación de los caldos con sal) se inoculan muy ligeramente con un cultivo recién obtenido. El inóculo debe ser tan ligero que no cause turbiedad antes de incubar los caldos. Los caldos se incuban a una temperatura de 35° a 37° C y se leen a las 18 a 24 horas. Si no hay crecimiento de un día para otro, se incuban hasta 7 días (Figura VI-7).

7. Prueba de Voges-Proskauer

El laboratorio de referencia de los Centros para el Control y la Prevención de Enfermedades (CDC) utiliza una modificación de la prueba de Voges-Proskauer que aumenta la sensibilidad con los vibriones. Según esta



Figura VI-7. *V. cholerae* crece en ausencia de NaCl (tubo B), pero el crecimiento se ve estimulado al agregarse NaCl al 1% (tubo A). El tubo C, NaCl al 0%, inoculado con *V. parahaemolyticus*, no muestra crecimiento.

Identificación de *Vibrio cholerae* en el laboratorio

modificación, en el medio (caldo de Voges-Proskauer con rojo de metilo [MR-VP]) se incorpora 1% de NaCl; además, el reactivo A consiste en 5% de alfa naftol en etanol absoluto, y el reactivo B es una solución de 0,3% de creatina en 40% de hidróxido de potasio (KOH). El microorganismo de prueba se incuba en el caldo de MR-VP durante 48 horas antes de que se agreguen los reactivos A y B. Un color rojo cereza indica una reacción positiva (Figura VI-8).

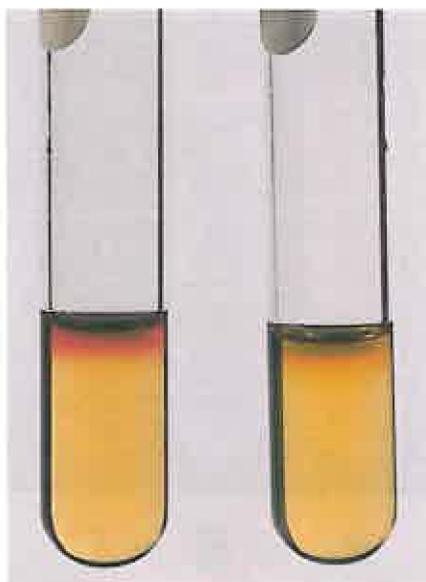
8. Sensibilidad al compuesto vibrlostático O/129

La sensibilidad de los microorganismos al fosfato de 2,4-diamino-6,7-diisopropil-pteridina (denominado compuesto O/129 o vibrlostático) se ha recomendado y usado como un método primario para diferenciar entre *Vibrio* (sensible al O/129) y *Aeromonas* (resistente al O/129). Si bien la mayor parte de los aislamientos de *V. cholerae* han sido sensibles al O/129, varios informes recientes han descrito aislamientos clínicos y ambientales que fueron resistentes a este compuesto. En dichos informes, aislamientos de *V. cholerae* O1 y distintos de O1 fueron resistentes a 10 y 150 μg de O/129, a semejanza de *Aeromonas*. Debe tenerse precaución cuando se recurre a esta prueba.

C. Pruebas de hemólisis

Históricamente, los biotipos clásico y El Tor se diferenciaban por la capacidad del grupo El Tor para lisar los eritrocitos. Sin embargo, hacia 1972 casi todos los aislamientos de El Tor en el mundo eran no hemolíticos. Las

Figura VI-8. *V. cholerae* produce acetoina, la cual se detecta en la prueba de Voges-Proskauer por la aparición (reacción positiva) de un color rojo (izquierda). A la derecha se observa una reacción negativa.



dos excepciones de esta tendencia han sido las clonas de *V. cholerae* O1 encontradas en las aguas del Golfo de México correspondientes a los Estados Unidos y en Australia, que son intensamente hemolíticas cuando se analizan en placa o en tubo (Cuadro VI-5). Por esta razón, la hemólisis sigue siendo un rasgo fenotípico útil para diferenciar las clonas de *V. cholerae* O1 de las dos regiones mencionadas de las cepas El Tor del resto del mundo, incluida América Latina.

1. Hemólisis en placa

Para obtener colonias aisladas, deben inocularse por estriación placas de agar sangre que contengan de 5% a 10% de sangre de carnero. Las placas se incuban a una temperatura de 35° a 37 °C durante 18 a 24 horas. Las colonias hemolíticas presentan zonas claras alrededor cuando se han lisado por completo los eritrocitos, y una cepa hemolítica presuntamente se debe comparar con una cepa testigo intensamente hemolítica (Figura VI-9). Las cepas que producen hemólisis incompleta (los eritrocitos no desaparecen por completo) no se deben notificar como hemolíticas.

En placas de agar sangre de carnero y en condiciones aerobias, *V. cholerae* no hemolítico frecuentemente produce una franja verdosa alrededor de las colonias confluentes, pero no en torno de las colonias bien aisladas. Este fenómeno, descrito con frecuencia como "hemodigestión", se produce por la inhibición de los subproductos metabólicos que se producen durante la incubación anaerobia de la placa de agar sangre. Por esta razón, cuando el crecimiento sucede en condiciones aerobias, la hemólisis se determinará alrededor de las colonias aisladas, no en las zonas de confluencia de colonias. Asimismo, las placas de agar sangre en condiciones aerobias no deben incubarse por más de 18 a 24 horas, ya que el efecto de hemodigestión se ve acentuado por períodos de incubación más largos.

La incubación aerobia de la placa durante 24 horas como máximo, aunque no es óptima para la detección de hemólisis, permitirá la diferencia-

Cuadro VI-5. Actividad hemolítica de *V. cholerae* O1, biotipos clásico y El Tor

Biotipo/ubicación	Actividad hemolítica
Clásico	Negativa
El Tor/Australia	Fuertemente positiva
El Tor/Costa del Golfo de México en los Estados Unidos	Fuertemente positiva
El Tor/América Latina	Negativa
El Tor/Asia, África, Europa, Pacífico*	Negativa

*Cepas aisladas entre 1963 y 1992.

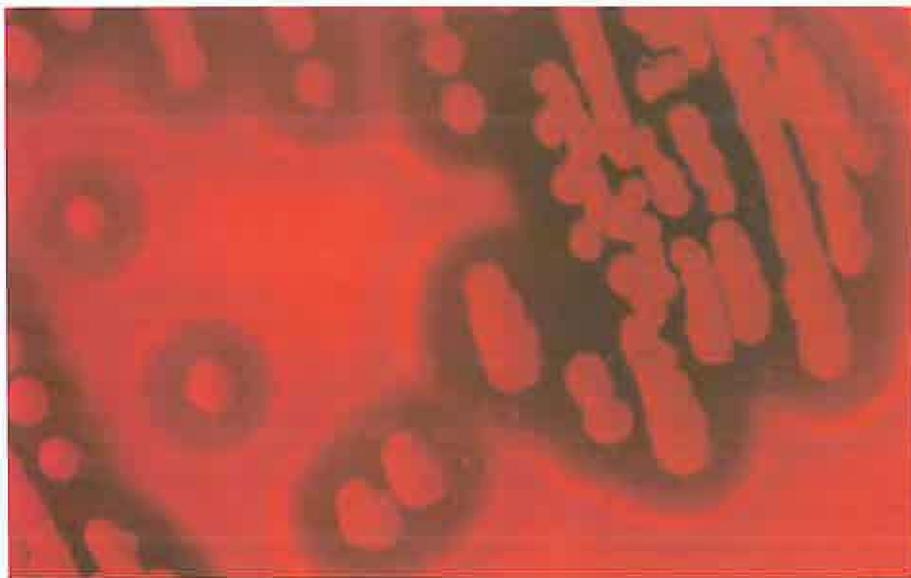


Figura VI-9. Cepa hemolítica de *V. cholerae* en una placa de agar con sangre de carnero.

ción de cepas intensamente hemolíticas, tales como las clonas de las aguas del Golfo de México correspondientes a los Estados Unidos y las de Australia, de las cepas no hemolíticas latinoamericanas. Si los resultados de la hemólisis en placa no son concluyentes, se recurre al método de hemólisis en tubo, el cual tiene menos riesgo de una falsa interpretación.

2. Hemólisis en tubo

Testigos: se utilizan dos cepas bien caracterizadas de *V. cholerae*; una debe ser acentuadamente hemolítica, y la otra, no hemolítica.

- 1) Se lavan 20 ml de eritrocitos de carnero en 25 ml de solución salina con amortiguador de fosfato (PBS), 0,01 M, pH de 6,8 a 7,2. El lavado se repite dos veces en cada ciclo, y se practican en total tres ciclos. Se prepara una suspensión al 1% (volumen/volumen) de concentrado ("paquete") de eritrocitos de carnero en PBS.
- 2) A partir del cultivo recién obtenido, las cepas de prueba y las testigo se inoculan en caldo de infusión de corazón (o caldo de tripticasa de soya) con 1% de glicerol (pH 7,4) y se incuban a una temperatura de 35° a 37 °C durante 24 horas. Después de la incubación, se centrifuga cada caldo para sedimentar las células bacterianas; se retira el sobrenadante con una pipeta Pasteur.
- 3) Se divide el sobrenadante en dos porciones iguales. Una alícuota se calienta a 56 °C durante 30 minutos. Se hacen diluciones dobles seriadas

en PBS (se diluye hasta 1:1.024) de los sobrenadantes calentados y no calentados.

- 4) Se agregan 0,5 ml de la suspensión al 1% de eritrocitos de carnero en PBS a 0,5 ml de cada dilución del sobrenadante.
- 5) Se incuban en baño de María a 37 °C durante dos horas. Se retiran las suspensiones del baño y se mantienen a 4 °C de un día para otro.
- 6) Se examinan en busca de signos de hemólisis. Los eritrocitos no lisados se depositarán en el fondo del tubo de prueba y formarán un "botón" (Figura VI-10). Si los eritrocitos se lisan por efecto de la hemolisina, no habrá botón. Los títulos de hemolisina se expresarán como la dilución más alta en la que se presentó hemólisis completa.
- 7) Se comparan los resultados de los sobrenadantes calentados y no calentados. Los tubos calentados no deben presentar hemólisis, ya que la hemolisina de *V. cholerae* es termolábil y, si se encuentra, se inactiva por la incubación a 56 °C (paso 3, arriba). Los títulos de 2 a 8 se consideran intermedios, y los de 16 o mayores, intensamente positivos.

D. Pruebas para determinar los biotipos de *V. cholerae* O1

La diferenciación de *V. cholerae* O1 en los biotipos clásico y El Tor no es necesaria para el control o tratamiento de los pacientes, pero puede

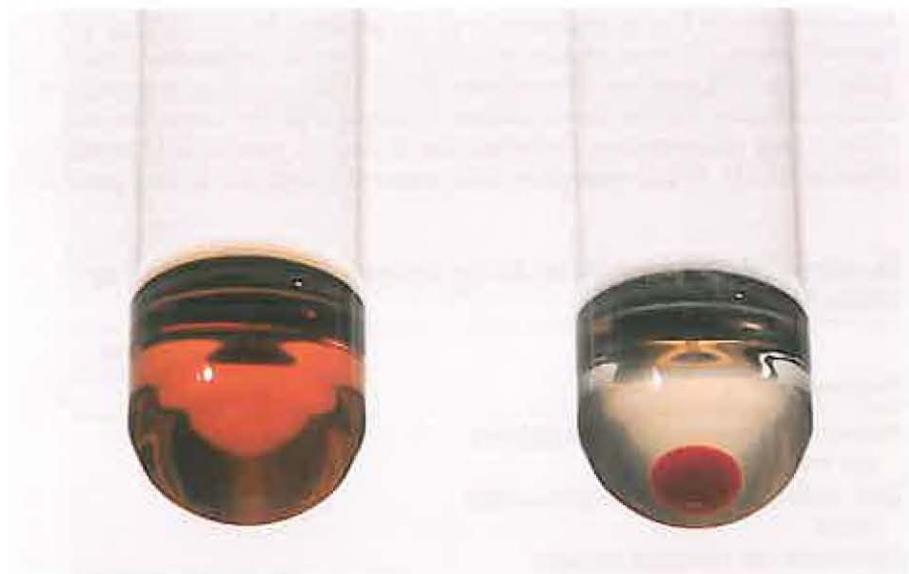


Figura VI-10. En el tubo de la izquierda se muestra la prueba de hemólisis en tubo, caracterizada por la ausencia de un "botón" de eritrocitos sedimentados y la presencia de hemoglobina libre en el sobrenadante.

Identificación de *Vibrio cholerae* en el laboratorio

ser de importancia en salud pública o en epidemiología para ayudar a identificar la fuente de la infección; particularmente cuando el cólera se diagnostica por primera vez en un país o zona geográfica. Solamente se debe biotipificar un número limitado de aislamientos cuidadosamente seleccionados. La biotipificación no es apropiada para *V. cholerae* distinto de O1, y las pruebas pueden dar resultados atípicos para *V. cholerae* O1 no toxigénico. Las pruebas enumeradas en el Cuadro VI-6 se utilizan corrientemente para determinar el biotipo de *V. cholerae* O1. Se deben utilizar por lo menos dos de estas pruebas para determinar el biotipo, debido a que los resultados varían entre los distintos aislamientos.

El biotipo El Tor es el que predomina actualmente en todo el mundo y es el único que se ha aislado en el continente americano. Es raro observar el biotipo clásico, excepto en Bangladesh.

1. Prueba de Voges-Proskauer

Para diferenciar entre los biotipos El Tor y clásico de *V. cholerae* O1, se utiliza la prueba de Voges-Proskauer. Por lo común, los biotipos clásicos dan resultados negativos, mientras que los aislamientos de El Tor generalmente son positivos.

2. Sensibilidad a la polimixina B

Para diferenciar los biotipos de *V. cholerae* O1 se ha utilizado la sensibilidad al antimicrobiano polimixina B (véase en la sección E de este capítulo la descripción de los procedimientos de las pruebas de sensibilidad a los antimicrobianos). En esta prueba se utiliza un disco de polimixina B de 50 unidades (Mast Diagnostics, Merseyside, Reino Unido) y cepas conocidas de biotipo clásico y El Tor como testigos. El biotipo El Tor suele ser resistente a esta concentración de polimixina B y no da una zona de inhibición (Figura VI-11). Si hay cualquier duda sobre el resultado de esta prueba, se

Cuadro VI-6. Diferenciación de los biotipos clásico y El Tor de *V. cholerae* serogrupo O1

Propiedad	Biotipo	
	Clásico	El Tor
Prueba de Voges-Proskauer (modificada con 1% de NaCl)	-	+
Zona alrededor del disco de polimixina B (50 U)	+	-
Aglutinación de eritrocitos de pollo	-	+
Lisis por bacteriófago:		
clásico IV	+	-
El Tor 5	-	+

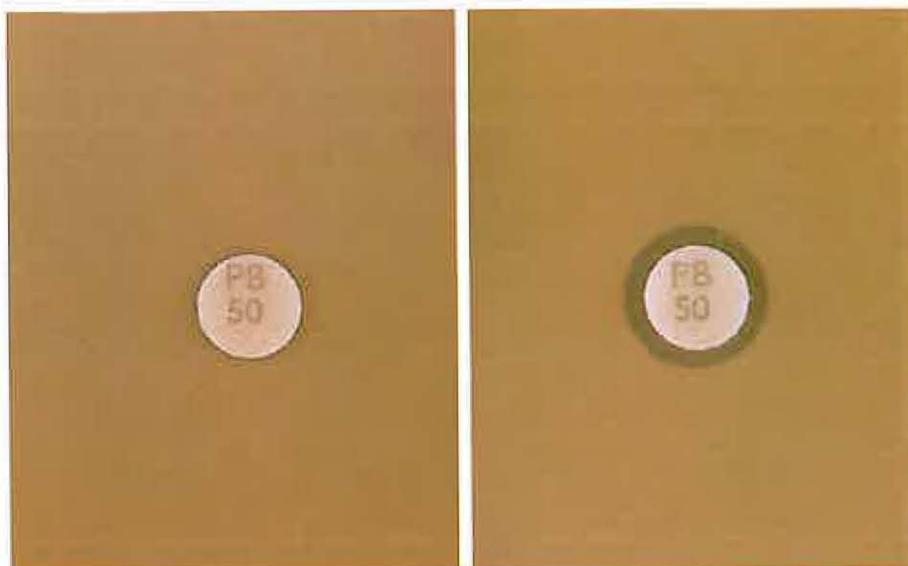


Figura VI-11. La cepa El Tor de *V. cholerae* O1, a la izquierda, es resistente a la acción del antimicrobiano polimixina B (disco de 50 unidades). La cepa clásica de *V. cholerae* O1, a la derecha, muestra una zona característica de inhibición.

realizan otras pruebas de biotipificación o el aislamiento se envía para confirmación a un laboratorio de referencia. Las cepas clásicas, por lo general, son sensibles a la polimixina B y darán una zona de inhibición. Debido a que el tamaño de la zona no es importante, cualquier zona se interpreta como un resultado positivo.

3. Hemaglutinación (prueba directa)

Se pueden utilizar eritrocitos frescos de pollo o de *carnero* para este análisis. A partir de eritrocitos lavados (tres veces) y concentrados (por centrifugación) se prepara una suspensión al 2,5% (volumen/volumen) en solución salina normal, después del lavado final. Se coloca una gran asada de suspensión de eritrocitos en una lámina de vidrio. Con una aguja o asa se toma una porción pequeña de colonias cultivadas en agar no selectivo y se mezcla bien con los eritrocitos. Cuando la prueba es positiva, la aglutinación de los eritrocitos ocurre en 30 a 60 segundos (Figura VI-12). Con cada nueva suspensión de eritrocitos se deben utilizar cepas testigo hemaglutinante (El Tor) y no hemaglutinante (clásica). Las cepas de *V. cholerae* O1 clásico que llevan mucho tiempo en el laboratorio o que son producto de pases repetidos en caldo pueden causar hemaglutinación y no deben utilizarse como testigos.



Figura VI-12. *V. cholerae* O1 biotipo El Tor aglutina los eritrocitos de carnero como se muestra a la izquierda. El biotipo clásico de *V. cholerae* O1, a la derecha, no aglutina los eritrocitos.

4. Sensibilidad a los bacteriófagos

Se puede determinar el biotipo por la sensibilidad de un aislamiento del serogrupo O1 de *V. cholerae* a un bacteriófago específico. Las cepas clásicas de *V. cholerae* O1 son sensibles al bacteriófago del cólera "clásico IV"; los aislamientos de El Tor son sensibles al bacteriófago "El Tor 5". Aunque estas pruebas son muy confiables, la propagación, el almacenamiento y el uso de bacteriófagos es técnicamente muy exigente y por lo común se realiza en muy pocos laboratorios de referencia. Si se requiere la determinación del biotipo mediante sensibilidad a bacteriófagos, debe realizarla un laboratorio que utilice comúnmente este método.

A continuación se describe en forma resumida el uso de bacteriófagos en la biotipificación de *V. cholerae* O1. El aislamiento que se va a someter a prueba proviene de un cultivo puro de 18 a 24 horas en un medio no inhibitorio. La muestra se inocula en caldo de infusión de cerebro y corazón (o caldo con tripticasa de soja) y se incuba durante 6 horas a una temperatura de 35° a 37 °C. A continuación, se siembra una muestra del aislamiento en la fase exponencial (logarítmica) del crecimiento (densidad óptica = 0,1) en una placa de agar de infusión de cerebro y corazón; para ese efecto, se humedece un hisopo de algodón en el caldo de 6 horas y se frota ligeramente toda la superficie. Las cepas testigo positiva y negativa también se deben inocular. Se aplica al cultivo bacteriano confluyente una gota

del bacteriófago a la dilución de prueba establecida (una medida de la concentración de partículas del bacteriófago activo). La placa se incuba de 18 a 24 horas y se lee entonces. Si las bacterias son sensibles al bacteriófago, se lisarán y habrá una zona de lisis en la capa de crecimiento confluyente.

E. Prueba de sensibilidad a los antimicrobianos (método de difusión de disco en agar)

Debido a que la resistencia antimicrobiana ha sido un problema que va en aumento en algunas partes del mundo, la sensibilidad de las cepas de *V. cholerae* O1 a los antimicrobianos debe vigilarse periódicamente. Aunque la técnica de difusión de disco es el método más corriente para efectuar pruebas de sensibilidad a los antimicrobianos, no se han establecido criterios interpretativos para *V. cholerae* O1 y se desconoce la confiabilidad del método para este microorganismo. Se deben utilizar los métodos de dilución en agar o en caldo para obtener resultados exactos de sensibilidad de *V. cholerae* O1. En el *Manual of Clinical Microbiology* se encuentra la descripción de estos procedimientos. Si un laboratorio no puede efectuar de rutina una de las técnicas de dilución, se utilizará el método de difusión de disco para investigar la resistencia antimicrobiana. En el Cuadro VI-7 se presentan los criterios de interpretación para los agentes antimicrobianos actualmente recomendados por la Organización Mundial de la Salud para el tratamiento del cólera (tetraciclina, doxiciclina, furazolidona, trimetoprima-sulfametoxazol, eritromicina y cloranfenicol) así como para otros antimicrobianos de uso común. Estos criterios, que se han estandarizado para la familia *Enterobacteriaceae*, pueden servir provisionalmente como pautas sobre el tamaño de la zona de inhibición para detectar la resistencia a los antimicrobianos de *V. cholerae* O1 hasta que se validen los criterios de interpretación. Al hacer la selección con el método de difusión de disco, cualquier aislamiento que encaje en la categoría de resistencia o sensibilidad intermedia se debe someter a prueba con un método de dilución para determinar la concentración inhibitoria mínima del fármaco en cuestión.

Procedimiento para la difusión de disco en agar

Para conocer una descripción más completa de este método, se sugiere al lector consultar el *Manual of Clinical Microbiology*.

El agar de Mueller-Hinton debe prepararse y esterilizarse en el autoclave de acuerdo con las instrucciones del fabricante. Una vez que se ha enfriado aproximadamente a 50 °C en baño de María, el medio se vacía en cajas de Petri de 15 × 150 mm de diámetro y con una profundidad de 4 mm (cerca de 60 a 70 ml por placa). Se secan las placas en una incubadora durante 10 a 30 minutos antes de su uso.

Se prepara un patrón de turbiedad de McFarland 0,5, para lo cual se agregan 0,5 ml de 1.175% de solución (peso/volumen) de cloruro bórico dihidratado ($\text{BaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$) a 99,5 ml de ácido sulfúrico al 1%. El patrón de turbiedad debe estar en un tubo de ensayo idéntico al que se utiliza para

Cuadro VI-7. Patrones correspondientes a la familia *Enterobacteriaceae* para la interpretación del tamaño de la zona de inhibición producida por determinados discos de antimicrobianos (no validadas para *V. cholerae* O1)

Agente antimicrobiano	Potencia del disco (µg)	Diámetro de la zona (mm) ^a			Límites del diámetro de la zona (mm) para <i>E. coli</i> ATCC 25922
		Resistente	Intermedio	Sensible	
Cloranfenicol	30	≤12	13 a 17	≥18	21 a 27
Doxiciclina	30	≤12	13 a 15	≥16	18 a 24
Eritromicina	15	≤13	14 a 22	≥23	8 a 14 ^b
Furazolidona	100	≤13	14 a 17	≥18	22 a 26 ^c
Trimetoprima-sulfametoxazol	1,25/ 23,75	≤10	11 a 15	≥16	24 a 32
Tetraciclina	30	≤14	15 a 18	≥19	18 a 25
Ciprofloxacina	5	≤15	16 a 20	≥21	30 a 40
Ácido nalidíxico	30	≤13	14 a 18	≥19	22 a 28

^aFuente: National Committee on Clinical Laboratory Standards (NCCLS), 1992. El NCCLS no ha establecido los tamaños de las zonas para *V. cholerae*.

^bFuente: Organización Mundial de la Salud.

^cFuente: Fabricante.

Identificación de Vibrio cholerae en el laboratorio

cultivar en el caldo el microorganismo en estudio. El patrón de McFarland se cierra con cera, cinta Parafilm u otro medio que permita evitar la evaporación, y se puede almacenar hasta por 6 meses a temperatura ambiente (22° a 25 °C) en la oscuridad.

Cada cultivo sujeto a prueba se sembrará por estriación sobre un medio de agar no inhibitorio (agar sangre, agar de infusión de cerebro y corazón o agar con tripticasa de soja) para obtener colonias aisladas. Tras la incubación a una temperatura de 35° a 37 °C por 18 a 24 horas, con una aguja o asa de inoculación se seleccionan colonias bien aisladas y se transfieren a un tubo de caldo estéril (caldo de Mueller-Hinton, caldo de infusión de corazón o caldo con tripticasa de soja). Se emulsifica una cantidad suficiente de cultivo bacteriano en el caldo, de tal forma que la turbiedad se aproxime a la del patrón de McFarland 0,5. Esta comparación se facilita si los tubos se observan contra el trasfondo de una hoja de papel blanco en la cual se han dibujado líneas negras netas. Si fuera necesario, la turbiedad se ajusta agregando caldo estéril. A los 15 minutos de haber ajustado el grado de turbiedad, se sumerge en la suspensión un hisopo estéril no tóxico. El hisopo se oprime con firmeza contra las paredes interiores del tubo, exactamente por encima del nivel del líquido, y se rota para eliminar el exceso de líquido. Se pasa tres veces el hisopo sobre toda la superficie del medio, trazando estrías y rotando la placa aproximadamente 60 grados después de cada aplicación para lograr la distribución uniforme del inóculo. Por último, se frota el hisopo siguiendo el borde de la superficie de agar.

Los discos de antimicrobianos deben guardarse en el refrigerador. Después de retirar los recipientes del refrigerador, se dejan cerrados a temperatura ambiente por una hora, aproximadamente, para permitir que la temperatura se equilibre. Esto reduce el grado de condensación que se presenta cuando el aire tibio alcanza el envase frío. Si se utiliza un aparato distribuidor de discos, este debe tener una cubierta que ajuste bien, guardarse en el refrigerador y dejarse entibiar a temperatura ambiente antes de su uso. Los discos de antimicrobiano se colocan en las placas tan pronto como sea posible, pero no más de 15 minutos después de la inoculación. Una vez que los discos se colocan en la placa, esta se pone en una incubadora a 35 °C durante 16 a 18 horas.

Después de la incubación por 18 a 24 horas, se mide el diámetro de la zona de inhibición completa (incluido el diámetro del disco) y se registra en milímetros. Las mediciones se pueden hacer con una regla en la superficie inferior de la caja de Petri, sin necesidad de destaparla. Con las sulfonamidas y la trimetoprima-sulfametoxazol, puede observarse un crecimiento escaso en la zona de inhibición. Cuando esto sucede, se prescinde de dicho crecimiento escaso (80% de inhibición) y el diámetro de la zona se mide hasta el borde del crecimiento abundante. Las zonas de inhibición del crecimiento se comparan con el cuadro de interpretación del tamaño de la zona (véase el Cuadro VI-7), y para cada fármaco sometido a prueba el resultado se anota como sensible, sensibilidad intermedia o resistente.

Identificación de *Vibrio cholerae* en el laboratorio

Las variaciones en los medios de cultivo, el tamaño del inóculo, el tiempo de incubación, la temperatura y otros factores influyen en las pruebas de sensibilidad. Para obtener resultados confiables es importante incluir microorganismos testigo con cada prueba y seguir el procedimiento con precisión (véase el Cuadro VI-7, donde aparecen los diámetros de las zonas de inhibición para la cepa de control de calidad). Una disminución en la potencia de los discos atribuible al almacenamiento puede ponerse de manifiesto por una disminución en el tamaño de la zona de inhibición alrededor de la cepa testigo.

Bibliografía

Barrett TJ, Blake PA. Epidemiological usefulness of changes in hemolytic activity of *Vibrio cholerae* biotype El Tor during the seventh pandemic. *J Clin Microbiol* 1981;13:126-129.

Barry AL, Thornsberry C. Susceptibility tests: diffusion test procedures. En: Balows A, Hausler WJ Jr, Herrmann KL, Isenberg HD, Shadomy HJ, editors. *Manual of Clinical Microbiology*. 5th ed. Washington, D.C.: American Society for Microbiology, 1991: 1117-1125.

Feeley JC. Classification of *Vibrio cholerae* (*Vibrio comma*), including El Tor vibrios, by infrasubspecific characteristics. *J Bacteriol* 1965;89: 665-670.

Kelly MT, Hickman-Brenner FW, Farmer JJ III. *Vibrio*. En: Balows A, Hausler WJ Jr, Herrmann KL, Isenberg HD, Shadomy HJ, editors. *Manual of Clinical Microbiology*. 5th ed. Washington, D.C.: American Society for Microbiology, 1991: 384-395.

Sahm DF, Washington JA II. Antibacterial susceptibility tests: dilution methods. En: Balows A, Hausler WJ Jr, Herrmann KL, Isenberg HD, Shadomy HJ, editors. *Manual of Clinical Microbiology*. 5th ed. Washington, D.C.: American Society for Microbiology, 1991: 1105-1116.

World Health Organization. Manual for Laboratory Investigations of Acute Enteric Infections. Geneva: World Health Organization, 1987; publication no. WHO/CDD/83.3 rev 1.